Criterion™ トランスブロットセル
取扱説明書

Catalog Numbers
170-4070
170-4071

ご使用前に

この取扱説明書を十分お読みください。
なお、この取扱説明書は紛失しないように製品の近くに保存してください。

BIO-RAD

目　次

Section１　ご使用にあたって ……1

1.1　はじめに ……1

1.2　仕　様 ……2

1.3　安全性 ……2

Section2　装置の組み立てと基本操作 ……3

2.1　ブロッティングの準備 ……3

2.2　転写の開始 ……5

2.3　酸性条件下での転写 ……5

Section3　転写条件 ……6

3.1　一般的な転写バッファーと転写条件 ……6

3.2　転写に関する諸注意 ……7

3.3　バッファー組成 ……8

Section4　最適な転写条件の検討 ……11

4.1　タンパク質のブロッティング ……11

4.2　DNAおよびRNAのブロッティング ……12

Section5　メンブレンの選択 ……13

5.1　タンパク質ブロッティング用メンブレン ……13

5.2　DNAおよびRNAブロッティング用メンブレン ……13

Section6　メンテナンス ……15

Section7　トラブルシューティング ……16

Section8　Ordering Information ……18

Section9　参考文献 ……20

Section10　保　証 ……21

Section 1　ご使用にあたって

1.1　はじめに

Criterionトランスブロットセルはポリアクリルアミドゲル中のタンパク質や核酸を電気的にメンブレンへ転写するために設計された装置です。Criterionトランスブロットセルはプレート電極と白金線電極のどちらかをお選びいただけます。

プレート電極の陽極は白金コーティングチタン製、陰極はステンレス製です。双方の電極間の距離は4.3cmで、２つまでのゲルホルダーカセットを電極間にセットできます。電源としてパワーパック200を用いることで、効率よく転写に必要な高電場を発生させることができます。

冷却は転写中の温度調節に必要となり、付属のアイスブロック、またはオプションのクーリングコイルを使用します。アッセンブリトレイは使用するメンブレン、ファイバーパッド、フィルターペーパー、ゲルの平衡化に使用し、また、ゲルホルダーへの設置に使用します。ローラーはゲルとメンブレンを密着させ、またサンドイッチアッセンブリーの間にトラップした気泡を除くために使用します。

1.2 仕　様

Criterion トランスブロットセルタンク

サイズ（W×D×H）		21.8×11.8×15 cm
材質		ポリサルフォン
必要バッファー量		1.3L

電極

サイズ		9.45×13.84 cm
材質	サポートカード	赤黒ポリサルフォン
	陽極プレート	白金コーティングチタン
	陰極プレート	ステンレス
	白金線電極	白金線
電極間距離		4.3 cm

カセット

サイズ	11.4×16.5 cm
材質	赤黒ポリサルフォン
最大ゲルサイズ	9.4×15 cm
ゲル枚数	Criterionゲル2枚もしくはレディーゲルJ4枚

ゲル／ブロットアッセンブリトレイ

材質	ポリカーボネイト
サイズ（W×D×H）	17.3×32.5×5.7 cm
セッティングブロック	17.3×14.3×3.2 cm
平衡化ブロック	17.3×12.1×3.2 cm

1.3 安全性

Criterionトランスブロットセルの電源には、external DC voltageのパワーサプライをご使用ください。パワーサプライは必ずアースをとってご使用ください。バイオ・ラッド製のパワーサプライは種々の安全設計が施されていますので安心してご使用いただけます。Criterionトランスブロットセルのご使用にあたっては、下記の操作条件を超えない出力範囲でお願いします。

最大出力電圧	300Volts DC
最大出力電力	200Watts
室　　温	50℃以下

電流はフタのセーフティーインターロック部分を通して流れます。フタが取り外されていると、電極に電流が流れないようになっていますが、フタを取り外す前には必ずパワーサプライの電源をお切りください。決してセーフティーインターロック付きのフタなしでご使用にならないでください。

本製品は、理化学機器の国際安全基準EN61010－1に適合した製品です。本取扱説明書に従って使用する場合には安全にご使用いただけます。EN61010-1適合外の装備やEN61010-1適合外のアクセサリーをCriterionトランスブロットセルと併用された場合は、安全性の保証はできませんのでご注意ください。

装置を無断で修理、改造しないでください。装置を改造した場合、

- 保証外です
- EN61010－1適合外です
- 安全性に問題がある可能性があります

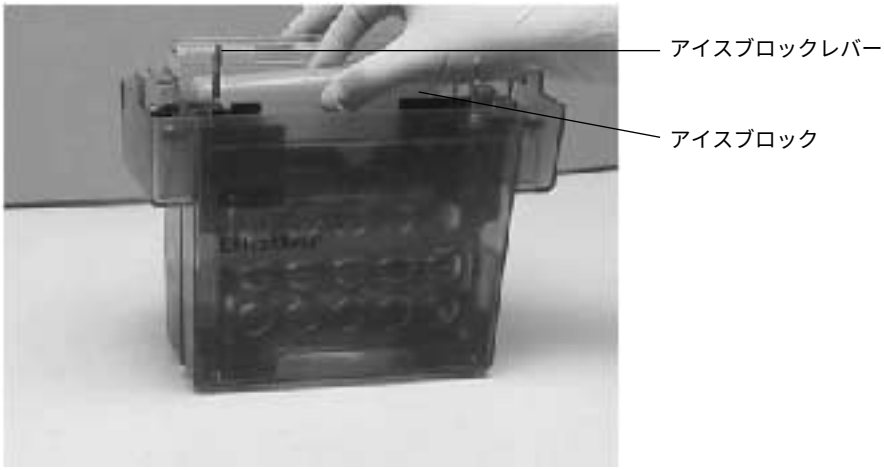
バイオ・ラッドでは定められた使用目的以外で使用したり、バイオ・ラッド以外の者による改造を行った場合に生じたケガやトラブルについては責任を負いかねます。

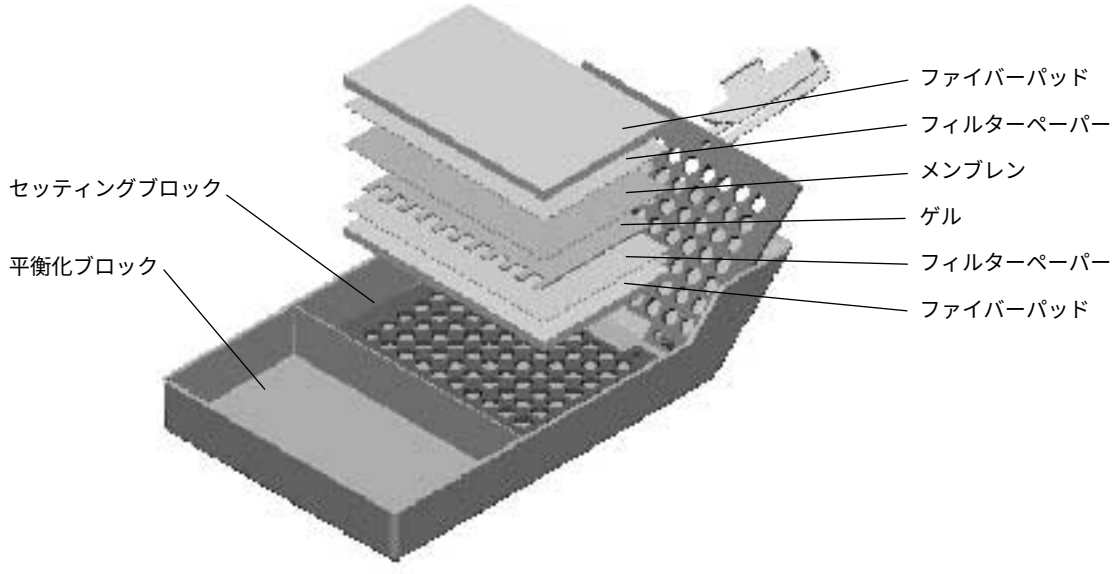
Section 2　装置の組み立てと基本操作

2.1　ブロッティングの準備

1. 転写バッファーを準備します。（バッファーの組成はSection3.3を参照ください。）熱の発生を抑えるために、使用するバッファーは4℃に冷却したものを使用してください。
2. ゲルを転写バッファーで15分間平衡化させてください。メンブレン、フィルターペーパー、ゲルを取り扱う際には、コンタミネーションを防ぐために手袋を着用してください。
3. 装置の組み立て
   a. Criterionトランスブロットセルのタンクの約半分まで転写バッファーを入れます。
   b. タンクの底にスターラーバーを入れます。
   c. セルの後ろにあるアイスブロックポケットにアイスブロックをセットし、固定するためのレバーをおろしてください。
   d. アイスブロックの代わりにオプションのクーリングコイルと流水チラーを接続してご使用いただくこともできます。（オーバーナイトでの転写を行う時などに必要となります。）

   ※アイスブロックはご使用前に必ず凍らせてください。

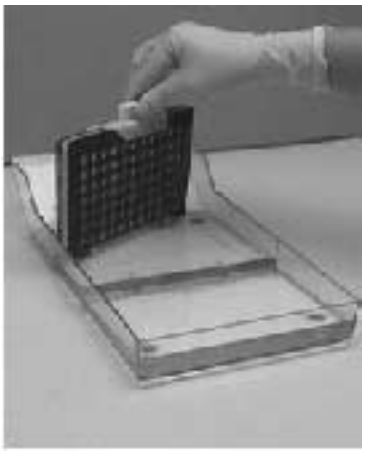




4. ゲルとメンブレンのセットの方法

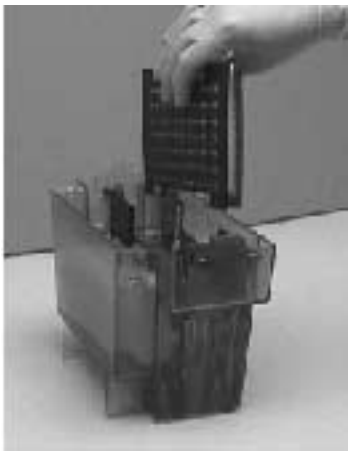
a. P.3の下図のようにゲル/ブロットアッセンブリトレイは平衡化ブロックとセッティングブロックに分けられます。平衡化ブロックが手前になるようにトレイを置きます。
b. 冷却した転写バッファーを平衡化ブロックに入れます。ここにメンブレン（ニトロセルロース、PVDFなど）を入れ、平衡化します。ｃからｅまでのステップを行っている間、メンブレンを浸しておいてください。
c. カセットを奥のセッティングブロックにセットします。カセットを開け、取っ手のついた赤い部分（陽極）が上に、黒い部分（陰極）が水平になるように置いてください。陰極部分の上にファイバーパッドを置き、ファイバーパッドが浸るまで転写バッファーを入れてください。（このとき、バッファー量が多過ぎるとゲルとメンブレンの密着がうまくいかず転写むらの原因となりますので注意してください。）
d. 完全に濡れたファイバーパッドの上にフィルターペーパーをのせます。
e. 前もって平衡化したゲルをフィルターペーパーの上に置きます。
f. メンブレンを取り出して、気泡がトラップされないように慎重にゲルの上に置きます。一度メンブレンとゲルが密着したら、転写むらやアーチファクトの原因となるので動かさないようにしてください。もしメンブレンを置き直したいときは新しいメンブレンを使用してください。ローラーを用いて気泡を除いてください。（下図参照）

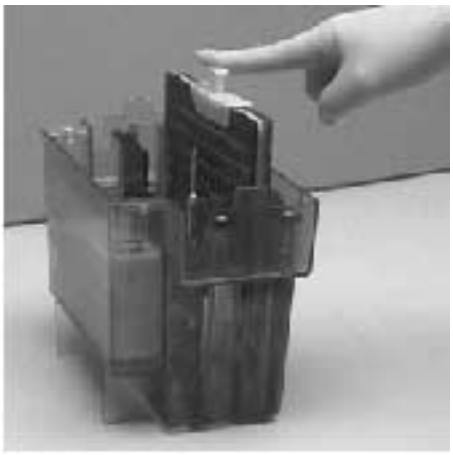
g. フィルターペーパーをメンブレンの上に置いてください。フィルターペーパーの上でローラーを静かに動かしてサンドイッチの中の気泡を除いてください。
h. 2枚目のファイバーパッドを平衡化ブロックで転写バッファーで濡らしてください。これを2枚目のフィルターペーパーの上にのせてください。
i. カセットのクランプサイドをおろしてしっかりとロックします。（下図参照）



2.2　転写の開始

a. ロックしたカセットをトランスブロットセルタンクの溝にはめます。このとき電極とカセットの色を合わせてセットしてください。スターラーバーが確実に動くことを確認してください。





b. 両方のカセットをセットしたら、タンクに記載されているラインまで転写バッファーを入れてください。
c. フタをして、電極プラグをブロッティング用のパワーサプライ（パワーパック200）に接続して転写を開始してください。転写条件は、Section3を参考にしてください。
d. 転写が完了したら、カセットを開いてメンブレンを取り出してください。セル、ファイバーパッド、カセットを十分に精製水で洗浄してください。

2.3　酸性条件下での転写

酸性条件下で転写を行う際は、ゲルとメンブレンの重ね方を通常とは逆にする、またはカセットの向きを逆に（カセットの黒色プレートが陽極側にくるように）してください。これによってメンブレンがゲルよりも陰極側にきます。酸性条件下では、タンパク質は陰極側に向かって転写されます。**電極自体を逆にしたり、電極バナナプラグとパワーサプライとの接続を逆にしたりしないでください。**これはプレート電極にダメージを与える原因になります。

Section 3　転写条件

3.1　一般的な転写バッファーと転写条件

Table3.1から3.4は、転写に使用されるバッファーの電気条件の目安になります。電気条件によって転写にかかる時間は変化します。他にも、グラジェントゲルは長い転写時間を必要とし、サンプルのタンパク質の分子量が小さい場合、一般的に転写時間は短くて済みます。また、ゲル内に残存してしまうタンパク質や、メンブレンを素通りしてしまうタンパク質もありますので注意が必要です。

Table 3.1　SDS-PAGEゲル

以下の条件は、12.5%　Tris-HCl　Criterionゲルを用いてE.coli　lysatesを泳動し、転写した場合の経験に基づいています。

バッファー：１×Tris/Glycine（組成は3.3バッファー組成を参照ください）

	20% Methanol	10% Methanol	15% Ethanol
プレート電極	100V 30分	100V 30分	おすすめしていません*
ワイヤー電極	100V 60分	100V 60分	おすすめしていません*

＊弊社のテストにおいて100V定電圧、1時間で約60%のE.coli　lysatesタンパク質しか転写されませんでした。100V定電圧でEthanol系のバッファーをご使用になる場合はより長い転写時間が必要となります。

Table3.2　SDS-PAGEゲル（CAPSベースバッファー）

以下の条件は、12.5%　Tris-HCl　Criterionゲルを用いてE.coli　lysatesを泳動し、転写した場合の経験に基づいています。

バッファー：10mM CAPSバッファー（組成は3.3バッファー組成を参照ください）

	20% Methanol	10% Methanol	15% Ethanol
プレート電極	100V 30分	100V 30分	100V 30分
ワイヤー電極	100V 60分	100V 30分	100V 60分

Table3.3　Native-PAGEゲル

以下の条件は、12.5%　Tris-HCl Criterionゲルを用いて4種類のNativeタンパク質：cytochrome C（pI 9.6）、lentil lectin(pI 8.2, 8.0, 7.8)、carbonic anhydrase(pI 6.0)、glucose oxidase(pI 4.5)を泳動し、転写した場合の経験に基づいています。

バッファー：１×Tris/Glycine（組成は3.3バッファー組成を参照ください）

Native-PAGE後のゲルの転写は、タンパク質の分子量と転写バッファーのpHに伴うタンパク質のpIに大きく依存します。タンパク質のpIが転写バッファーのpHより大きい場合、タンパク質はプラスの電荷をもち陰極側へ移動します。転写時間はサンプルにあわせて経験的に決めていただく必要があります。

プレート電極	12時間	30分
	最大10V	50V
	最大50mA	750―950mA
ワイヤー電極	12時間	60分
	最大10V	50V
	最大50mA	300―500mA

Table3.4　DNAとRNA

以下の条件は、5% TBE Criterionゲルを用いてFITC用蛍光標識DNAサイズスタンダードを泳動し、転写した時の経験に基づいています。

バッファー：１×TBE（組成は3.3バッファー組成を参照ください）

プレート電極	12時間	30分
	10V	50V
	100mA	750―950mA
ワイヤー電極	12時間	60分
	20V	50V
	100mA	300―500mA

3.2　転写に関する諸注意

1. ゲルの平衡化

ゲルは転写バッファーであらかじめ平衡化しておく必要があります。（Native-PAGEやDNAの電気泳動では、一般的に泳動バッファーと転写バッファーが同じなので平衡化は必要ありません。）平衡化は、泳動バッファー中の塩の除去や中和のために行います。もし塩が除去できていないまま転写を行うと、転写バッファーの電導性が上がり、転写中に発生する熱が増大します。また、メタノール系バッファー中でゲルは若干縮みます。あらかじめ平衡化することで、転写中にゲルが縮むのを防ぎます。

2. 電流値

パワーパック200は200Wまで出力できます。電流値のリミットをセットしないと最大出力で電流を供給し続けます。このような使用方法ではゲルホルダーカセットや電極プレートのひずみの原因となり、転写バッファーが高温になる可能性があります。そのため安全性に問題が生じます。電流値と転写時間をセットする際には、パワーパック200の取扱説明書をよくお読みください。

3. 電極の交換（プレートタイプ）

プレート電極の陽極と陰極を反対に取り付けないでください。これは陰極のステンレスプレートが腐食したり錆びたりする原因になります。もしステンレスプレートが錆びてしまった場合は、研磨用洗剤を用いて取り除いてください。

4. 熱の消散

転写効率がよく感度の高い転写を行うためには、熱を消散させることが必要です。発生した熱を消散させるのに以下の二つの方法があります。

1. アイスブロックを用いる方法
   1時間以内で終了する転写に適しています。
2. オプションのクーリングコイルをチラーにつないで用いる方法
   これは、正確な温度調整を必要とする場合や、高い電気条件で転写時間が1時間をこえる場合に用いてください。Criterionトランスブロットセルのタンクには断熱材を用いておりますので、より効果的に熱を消散させることができます。

5. スターラーバーの使用

Criterionトランスブロットセルで転写を行う際には、必ずスターラーバーを用いて転写バッファーを攪拌し続けてください。撹拌することで電導性が一定に保たれ、発生する熱を効率的に消散させることができます。

6. 転写バッファーのpH

特に記載がない限り、**転写バッファーのpHは調整しないでください。**転写バッファーのpH調整を行うと転写バッファーの電導性が上がる原因となります。

7. 推奨している転写バッファー

メタノールは純度の高いものをご使用ください。純度の低いメタノールは転写バッファーの電導性を上げ、低分子の転写効率を低下させる原因となります。転写バッファーは1回の転写でそのpHを一定に保つ効力をほとんど失っていると考えられますので、**再利用はお薦めしておりません。**また、転写バッファーを推奨している濃度以下に希釈して使用すると、緩衝能力を低下させることとなりますのでお薦めしておりません。

8. 電気条件

Table3.1から3.4に記載されている条件のうち、12時間かけて転写を行う場合、12時間を超える設定はしないでください。転写バッファーの電導性は、表に示しました電流値に近づけて、電流値の最大値をパワーサプライでセットする必要があります。もし低電圧で12時間かけて転写を行うことがサンプルに適さない、もしくは高電圧での転写が必要な場合は、転写時間を短くするように調節してください。転写時間を短くしない場合、安全性の保証はいたしかねます。

9. 以下のことによって、抵抗値や電流値が変化します。

・転写バッファーの調製法に変化があった場合。例えば、SDSを添加した場合、酸を添加してイオン強度を変化させた場合、pHの調製をした場合。
・ゲルのpH、イオン強度、アクリルアミド濃度の違い、さらに電気泳動が終了したゲルを十分に平衡化していない場合。
・ゲル枚数の変化：ゲルの枚数が増えた場合、電流値も若干上がります。
・転写温度が変化した場合。温度が上昇すると電流値も上がります。

3.3 バッファー組成

以下に示します試薬量は、すべて１Lの転写バッファーを作製する際のものです。Criterionトランスブロットセルで転写を行うにはタンクを満たすのに1.3L、ゲルやメンブレンを平衡化するのに300～500mlの転写バッファーが必要となります。**合計1.6～1.8Lの転写バッファーを作製してください。**バイオ・ラッドではプレミックスバッファーをご用意いたしております。

酸や塩基性化合物を加えてpHの調製をしないでください。メタノールは特級試薬を用いてください。純度の低いメタノールをご使用になられますと、メタノール中の金属イオンが電極をメッキしてしまい、電極が劣化する原因になります。メタノールやエタノールは常に最後に加えてください。

Note：pH電極にはTrisバッファーのpHを測定するのに適さないものもあります。もしメーターが振切れてしまうような場合は、ご使用になられているpHメーターがTrisバッファーに適したものかどうか、仕様をご確認ください。Trisバッファーに適したpHメーターを用いてその値が8.0以下であった場合は、バッファーを作製し直してください。

1. SDS-PAGE用ゲル

20%メタノールTowbinの転写バッファー

25mMトリス、192mMグリシン、20%（v/v）メタノール、pH 8.3

a) プレミックスバッファーを使用する場合
100ml 10×Tris/Glycineバッファー
カタログ番号161-0734：1Lボトル
カタログ番号161-0771：5Lキューブ
700ml dd H_2O
200mlメタノール

b) 試薬から調製する場合
トリス 3.03ｇ、グリシン14.4gを600mlのdd H_2Oに溶解し、これをdd H_2Oで800mlにメスアップします。
ここに200mlのメタノールを加えます。

10%メタノールTowbinの転写バッファー

25mMトリス、192mMグリシン、10%（v/v）メタノール、pH 8.3

a) プレミックスバッファーを使用する場合
100ml 10×Tris/Glycineバッファー
カタログ番号161-0734：１Lボトル
カタログ番号161-0771：5Lキューブ
800ml dd H_2O
100mlメタノール

b) 試薬から調製する場合
トリス 3.03ｇ、グリシン14.4gを600mlのdd H_2Oに溶解し、これをdd H_2Oで900mlにメスアップします。
ここに100mlのメタノールを加えます。

20%メタノール CAPSバッファー

10mM CAPS（3-(cyclohexylamino)-1-propane sulfonic acid)、20%（v/v）メタノール、pH 11.0
試薬調製
CAPS 2.21gを600mlのdd H_2Oに溶解し、NaOHでpH 11.0に調整します。dd H_2Oで800mlにメスアップします。
ここに200mlのメタノールを加えます。

10%メタノール CAPSバッファー

10mM CAPS（3-(cyclohexylamino)-1-propane sulfonic acid)、10%（v/v）メタノール、pH 11.0
試薬調製
CAPS 2.21gを600mlのdd H_2Oに溶解し、NaOHでpH 11.0に調整します。dd H_2Oで900mlにメスアップします。
100mlのメタノールを加えます。

15%メタノール CAPSバッファー

10mM CAPS（3-(cyclohexylamino)-1-propane sulfonic acid)、15%（v/v）メタノール、pH 11.0
試薬調製
CAPS 2.21gを600mlのdd H_2Oに溶解し、NaOHでpH 11.0に調整します。dd H_2Oで850mlにメスアップします。
150mlのメタノールを加えます。

2．Native-PAGE用ゲル

25mMトリス、192mMグリシン、pH 8.3

a) プレミックスバッファーを使用する場合

100ml 10×Tris/Glycineバッファー

カタログ番号161-0734：１Lボトル

カタログ番号161-0771：5Lキューブ

900ml dd H_2O

b) 試薬から調製する場合

トリス 3.03ｇ、グリシン14.4gをdd H_2Oに溶解して、1Lにメスアップします。

3．核酸分析用ゲル

TBE（トリス/ホウ酸/EDTA）

89mMトリス/ホウ酸、2mM EDTA、pH 8.3

100ml 10×TBEバッファー

カタログ番号161-0733：１Lボトル

カタログ番号161-0770：5L

900ml dd H_2O

TAE（トリス/酢酸/EDTA）

40mMトリス/酢酸、1mM EDTA

20ml 50×TAEバッファー

カタログ番号161-0743：１Lボトル

カタログ番号161-0773：5Lキューブ

980ml dd H_2O

Section 4　最適な転写条件の検討

4.1　タンパク質のブロッティング

一般的に変性した高分子タンパク質を定量的に溶出することは困難です。次に挙げた条件について検討を加えることで転写効率の向上が予想できます。

1．メンブレンへの転写がうまくいかない原因として、ゲルとメンブレンが密着していない場合があります。密着が完全でない場合、ゲルとメンブレンの間に過剰なバッファーがある状態になります。ローラーまたはチューブ等を利用して、ゲルとメンブレンをしっかり密着させてください。適切なフィルターペーパーを使用することも重要です。前もって転写バッファーで15分間平衡化しておくことで、転写中のゲルやメンブレンの縮みを防止でき、ゲル由来の尿素やSDSなど妨害物の影響を軽減することができます。
2．転写時間を延長します。十分な転写を行うために予備実験を行ってください。転写時間は、最短30分から最大でオーバーナイト(12時間)の選択幅がありますが、オーバーナイトで転写を行う場合は、熱の発生を最小限に抑えるために設定電圧を30-50Vに抑えてください。（高電圧で長時間転写をする場合は、オプションのクーリングコイルを用いてください。）
3．設定電圧を上げます。予備実験を行って、単位電極間距離あたりの電圧値（V/cm）の最適条件とその条件下での転写中の温度変化について確認をしてください。転写温度の上昇に伴って、タンパク質の変性状態が変化して、同様に転写バッファーの抵抗が下がり、消費電力が上昇します。これは転写効率にも影響を与えます。
4．転写バッファーの種類とpHの変更
   a. 転写バッファーの強度を減らします。転写バッファーを希釈すると、かけた電圧に対して通常よりも低い電流が流れます。そのため、熱の発生を抑えながら高電圧をかけることが可能です。
   b. タンパク質の大きさに対する電荷を最大にします。アルコールを含むSDS転写バッファーを使用するとタンパク質はSDSから解離します。そのため塩基性タンパク質は、トリス/グリシン/メタノール（pH8.3）バッファー中での等電点が中性付近となり、転写効率が落ちます。例えばリゾチームはこの性質を示します。リゾチームやヒストンに代表されるこれら塩基性タンパク質を転写するにはpH8.5〜10.0の転写バッファーを用いることが必要です。
   c. 同じ単位電極間距離あたりの電圧値（V/cm）であっても転写バッファーの種類が異なると、異なった転写結果が得られます。一般的にトリスバッファーを用いたほうが、酢酸バッファーやリン酸バッファーよりも効率的な転写が行えます。
   d. 終濃度0.1%になるようにSDSをトリス/グリシン/メタノールバッファーに加えると転写効率が上がると報告されています。しかし、SDSは電流、電圧、発熱量の上昇をもたらします。また10℃以下ではSDSは沈殿するので転写開始温度は高めに設定しなければなりません。またSDSはタンパク質によっては抗原性に影響を与えます。SDSはゲルからのタンパク質の溶出を増加させますが、ニトロセルロースメンブレンへのタンパク質の結合効率を低下させます。
   e. 転写バッファーからアルコールを除きます。転写バッファー中のアルコールはSDS結合タンパク質とニトロセルロースメンブレンとの結合効率を改善します。アルコールを転写バッファーから除くと転写効率は上昇しますが、ニトロセルロースへの結合性が悪くなります。アルコールはゲルの孔径を収縮させるため、高分子のタンパク質はゲルの網目から移動しにくくします。
5．他の種類のメンブレンを使用します。詳細はSection5で述べておりますが、PVDFメンブレンは転写バッファー中のアルコールが少ない状態でもタンパク質を結合させます。PVDFメンブレンを用いることで、ニトロセルロースメンブレンではぬけでてしまうような低分子のタンパク質の転写が可能です。ケミルミネッセンスやその他発色系検出にはイミュン-ブロットPVDFメンブレン（カタログ番号162-0174、162-0175、162-0176、162-0177）に適します。プロテインシーケンスや質量分析にはシーケ-ブロットPVDFメンブレン（カタログ番号162-0186、162-0180、162-0181、162-0182、162-0184）に適します。

4.2　DNAおよびRNAのブロッティング

核酸の溶出を効果的に行うためには、一般的にゲル濃度を変えることで改善されます。しかし、大量のDNAを定量的に転写するのは非常に難しいことです。溶出条件を考慮する際、以下のことも検討してみてください。

1．ゲルの組成の変更

a. アクリルアミドゲルの場合、%T（総モノマー濃度）、%C（架橋度）を下げてください。

b. アガロースゲルの場合、アガロース濃度を下げてください。これにより、大きなサイズのDNAの溶出が改善されます。

2．DNAの変性法の変更

変性剤として、NaOHの代わりにグリオキサールを用いるとDNAの溶出がより効率的になります。DNAの変性のためにポリアクリルアミドゲルを煮沸させても良い結果が得られます。塩基を用いた変性によってポリアクリルアミドゲルは脆くなり、ブロッティングしたメンブレンにはり付きやすくなります。

Section 5　メンブレンの選択

5.1　タンパク質ブロッティング用メンブレン

PVDFメンブレン

バイオ・ラッドでは、イムノアッセイ用メンブレン（イミュン-ブロットPVDF）と、プロテインシーケンス用メンブレン（シーケ-ブロットPVDF）の2種類のPVDF（Polyvinylidene difluoride）メンブレンをご提供しています。PVDFメンブレンは酸性や塩基性が強い条件下や有機溶媒中においてもタンパク質を結合します。

このようなタンパク質結合能によって、転写されにくいタンパク質や、高分子タンパク質を転写するための高い転写条件下（転写時間の延長や高い電圧）において、タンパク質がメンブレンからぬけ出てしまうことを防ぐことができます。このような強い保持力によってより高い転写効率を維持でき、プロテインシーケンス等にも適しています。

SDS入りの転写バッファーを使用することで、より効果的にタンパク質がメンブレンに結合します。

PVDFメンブレンは使用前に100%メタノールでの前処理が必要になります。

ニトロセルロースメンブレン

ニトロセルロースメンブレンはタンパク質の転写・検出に広く用いられます。ニトロセルロースメンブレンに結合している総タンパク量を見るには簡便な色素染色（アミドブラック、クマシーブルー、ポンソーS、Fast Green FCFなど）を使用することができ、またより高い感度を得るために金コロイド染色などを行うこともできます。また、非特異的タンパク質のメンブレンへの結合を容易に防止できます。ニトロセルロースメンブレンはPVDFメンブレンと異なり、前処理が必要ありません。

低分子のタンパク質（特に20kDa以下のもの）は、転写後の洗いの操作中にメンブレンから抜けてしまう可能性があるので、感度の高い検出法が求められます。ポアサイズが0.2μmのニトロセルロースメンブレンはこのような低分子タンパク質の逸脱を防ぐのに効果的です。SDSによって変性された高分子タンパク質（約100kDa）を転写する場合、転写バッファー中のアルコールによって転写効率が下がることがあります。アルコールは、一般的にSDSの結合したタンパク質のニトロセルロースメンブレンへの結合を増加させますが、ゲルのポアサイズを小さくして、タンパク質はゲルから移動しにくくなります。転写バッファーにSDS（最大0.1%まで）を加えることで、高分子のタンパク質の溶出は促進されますが、メンブレンへのタンパク質の結合が阻害されます。また、SDSにはバッファーの電導性を高めたり、熱の発生を高める働きがあります。

5.2　DNAおよびRNAブロッティング用メンブレン

ゼータープローブメンブレン

核酸の電気的な転写を効果的に行うには、10×SSCのような塩濃度の高い転写バッファーが必要になり、ニトロセルロースメンブレンは適しません。500bpの核酸は、転写バッファーの塩濃度を高くしてもすべてが転写されるわけではありません。塩濃度の高い溶液中では、低い電圧でたくさんの電流が流れるようになっています。

メンブレンへの転写は単位面積あたりの電圧に依存しますので、これは転写がうまくいきづらい環境であることを示しています。ゼータープローブメンブレンは、10bpを越えるすべての1本鎖DNAおよびRNAに関して低いイオン強度の存在下で効果的な結合結果を得ることができます。ゼータープローブメンブレンは核酸分析において、ニトロセルロースメンブレンのかわりとして用いるのに理想的な支持体です。結合は強固で、ブロッティングの際の洗浄、10回のリプロービングが可能です。

Table5.1　タンパク質ブロッティングにおけるメンブレンの選択

イミュンブロットアッセイには様々なメンブレンがご利用になれますので、用途に合わせて最適なメンブレンを選択していただくことが重要です。メンブレンの物理的性質と特徴を下記の表に示します。

メンブレン	ポアサイズ	結合容量 （μg/ cm^2）	備　考
ニトロセルロース	0.45μm 0.2μm	80-100	一般的なタンパク質のブロッティングに用いられます。ポアサイズ0.2μmは、低分子のタンパク質の転写に有効です。
サポート付ニトロセルロース	0.45μm 0.2μm	80-100	不活性高分子支持体の両面にニトロセルロースをコートしてあります。機械的強度にすぐれ、比較的壊れやすい0.2μmニトロセルロースメンブレンの取扱も容易になりました。
イミュンブロットPVDF	0.2μm	150-160	機械的強度、化学的安定性にすぐれています。バックグランドを低く抑え、SDS存在下でもタンパク質を容易に結合することができます。ウエスタンブロットに適しています。
シーケブロットPVDF	0.2μm	170-200	機械的強度、化学的安定性にすぐれています。SDS存在下でもタンパク質を結合させ、プロテインシーケンスに適しています。アルコールでの前処理が必要です。

Section 6　メンテナンス

クリーニング：電極、カセット、バッファー槽のクリーニングにはマイルドな洗剤とぬるま湯を使用してください。プレート電極のクリーニングには特にご注意ください。白金線を伸ばしたり、切ったりしないでください。

白金電極プレートに傷をつけたり歪めたりしないでください。また、研磨剤や強い界面活性剤を使用しないでください。陽極プレート（ステンレス）はマイルドな研磨剤を使用して操作中に付着した塩を取除いてください。ファイバーパッドは、熱いお湯ですすいだ後、精製水ですすぎ直してください。

化 学 耐 性：本製品は塩素系炭化水素（クロロホルム等）、芳香族炭化水素（トルエン、ベンゼン等）、アセトン等の有機溶媒は使用できません。ご使用上薬品耐性が不明な場合はお問い合わせください。

Section 7　トラブルシューティング

転写効率が悪い

1．タンパク質が逆の方向へ抜けてしまった。
ゲルとメンブレンをセットする順番が間違っているか、またはカセットをセットする向きが間違っています。正しくセットしてください。
また、パワーサプライへのプラグの接続を確認してください。

2．適した検出方法で行われていない。または、サンプルの濃度が十分でない。
検出法の感度を確認するために陽性または陰性コントロールをおいてください。（それぞれの検出キットのマニュアルを参考にしてください。）

3．転写時間が短い。
転写時間を少し長めにしてください。

4．タンパク質の電荷が十分でない。
バッファーのｐH付近のｐIをもつタンパク質は転写されにくいので、タンパク質の移動度が増すように転写バッファーのｐHをより酸性側または塩基性側にして転写を行ってください。

5．パワーサプライの回路が断絶している。
ヒューズの確認をしてください。また、パワーサプライがブロッティングに適した仕様であるか確認してください。

6．メタノールの影響
メタノールの量を減らすことで、ゲルから効率的にタンパク質が移動できるようになります。しかし、メンブレンへのタンパク質の結合を低下させます。

タンパク質がゲル中で沈殿（凝結）している

1．転写バッファーにSDSを加えたものを使用してください。SDSは転写効率を高めます。ただし、ニトロセルロース膜との結合を弱くし、タンパク質と抗体との反応に影響を及ぼしますのでご注意ください。

転写パターンに白抜きがある、転写されない部分がある

1．メンブレンとゲルとの密着が悪い。気泡や過剰の水分がメンブレンとゲルの間に残っている。
・完全に密着するまで付属のローラーをゲルとメンブレンを重ねた上から注意しながら転がして、気泡や過剰な水分を取除いてください。
・ 厚いフィルターペーパーを使用してください。
・ファイバーパッド取り替えてください。使用回数が増すとファイバーパッドが消耗し、ゲルとメンブレンの密着を保持することができなくなります。

2．メンブレンが完全に転写バッファーに浸されていない。または途中で乾燥してしまった。
・ニトロセルロースメンブレンの白いスポットは乾燥した部分で、ここにはタンパク質は結合しません。一度乾燥してしまったメンブレンは、転写バッファー中に簡単にくぐらせたくらいでは十分に浸透しません。精製水を沸騰させ、その中にメンブレンを浸してください。使用まで転写バッファーで十分平衡化させておいてください。
・PVDFメンブレンは疎水性の強いメンブレンなので、転写バッファーで平衡化させる前にメタノールを用いた処理が必要です。方法は、PVDFメンブレンのマニュアルを参考にしてください。

3． 電気泳動がうまくいっていない。
電気泳動の際にアーチファクトが出現する原因として、ゲルの未重合、不適当な泳動条件、泳動バッファーへのコンタミ、サンプルアプライ量が多すぎる等が考えられます。マニュアル等で電気泳動の方法を確認してください。

ゲルカセットの跡がメンブレンに転写されてしまう

1．ファイバーパッドが汚れている、またはファイバーパッドが薄くなってしまった。
- ファイバーパッドを丁寧に洗浄してください。ファイバーパッドが薄くなってしまった場合は、新しいものと取り替えてください。

2．転写バッファーがコンタミしている。
- 新しい転写バッファーを作製し、使用してください。

ニトロセルロースメンブレンに結合するタンパク質の量が少ない

1．転写バッファーに終濃度20%になるようにメタノールを加えることで最良のタンパク質結合性を得られます。
- 正しいメタノール含量の転写バッファーを作製してください。

2．タンパク質がメンブレンを通り抜けている。
- 高いタンパク質結合能を持つPVDFメンブレンかナイロンメンブレン、またはポアサイズ0.2μmのニトロセルロースメンブレンを使用してください。
  また、転写の際電圧を下げてください。

3．15kDa以下のタンパク質はポアサイズ0.45μmのニトロセルロースメンブレンでは結合性が低くなります。また、アッセイ中の洗浄操作でタンパク質がメンブレンから抜けてしまうことがあります。
- 高いタンパク質結合能を持つPVDFメンブレンかナイロンメンブレンを使用してください。
- 洗浄と抗体を反応させるステップで界面活性剤Tween-20を使用してください。タンパク質にとって厳しい条件となるものをなるべく減らしてください。

4．転写バッファー中のSDSは、タンパク質のニトロセルロースメンブレンへの結合能を低下させます。
- 転写バッファー中のSDSの量を減らすか、またはSDSを除いてください。

5．メンブレンが転写バッファーで完全に平衡化されていない。
- メンブレンの白いスポットは乾燥した部分で、ここにはタンパク質は結合しません。一度乾燥してしまったメンブレンは、転写バッファー中に簡単にくぐらせたくらいでは十分に浸透しません。精製水を沸騰させ、その中にメンブレンを浸してください。使用まで転写バッファーで十分平衡化させておいてください。

PVDFメンブレンに結合するタンパク質の量が少ない

1．メンブレンが転写バッファーで完全に平衡化されていない。
- PVDFメンブレンは疎水性の強いメンブレンなので、転写バッファーで平衡化させる前にメタノールを用いた処理が必要です。方法は、PVDFメンブレンのマニュアルを参考にしてください。

2．メンブレンが操作途中で乾燥してしまった。
- 完全に平衡化されているメンブレンは半透明でグレーです。メンブレンの白いスポットは乾燥してしまった部分で、ここにはタンパク質は結合しませんのでメンブレンを再度メタノールで前処理し、転写バッファーで平衡化してください。

電気条件が低すぎる、または高すぎる
- 開始時の電流値を毎回確認してください。ある特定の電圧設定で電流値は低くなる恐れがあります。転写バッファーが不適当だと、電導性が低くなりすぎて転写に必要な電力が供給されない可能性があります。
- 転写バッファーを作製し直してください。また、電圧の設定条件を変更してください。

免疫検出

バックグランドが高い、シグナルが低い、陽性コントロールが発色しないといった場合は、検出キットまたは試薬のマニュアルを参考にしてください。

総タンパク質の定量

染色キット、または検出キットのマニュアルを参考にしてください。

Section 8　Ordering Information

Criterionトランスブロットセル

カタログ番号	製品名
170-4070	Criterionプレートトランスブロットセル プレート電極、バッファー槽、パワーケーブル付蓋、ゲルホルダーカセット（2）、フィルターペーパー（50）、 ファイバーパッド（4）、ゲル/ブロットアッセンブルトレイ、シールドアイスクーリングユニット、ローラー及びマニュアル
170-4071	Criterionワイヤートランスブロットセル ワイヤー電極、バッファー槽、パワーケーブル付蓋、ゲルホルダーカセット（2）、フィルターペーパー（50）、 ファイバーパッド（4）、ゲル/ブロットアッセンブルトレイ、シールドアイスクーリングユニット、ローラー及びマニュアル
170-4076	Criterionトランスブロットセルクーリングコイル
170-4080	Criterionゲルホルダーカセット（1）
170-4085	フィルターペーパー（50）　9.5×15.2 cm
170-4086	ファイバーパッド（4）　9.5×15.2 cm
170-4089	Criterionゲル/ブロットアッセンブルトレイ
165-1279	ローラー

フィルターペーパーサンドイッチ、メンブレン

カタログ番号	製品名
162-0212	0.2μmニトロセルロース/フィルターペーパーサンドイッチ　7×8.5 cm、20パック
162-0213	0.2μmニトロセルロース/フィルターペーパーサンドイッチ　7×8.5 cm、50パック
162-0232	0.2μmニトロセルロース/フィルターペーパーサンドイッチ　8.5×13.5 cm、20パック
162-0233	0.2μmニトロセルロース/フィルターペーパーサンドイッチ　8.5×13.5 cm、50パック
162-0214	0.45μmニトロセルロース/フィルターペーパーサンドイッチ　7×8.5 cm、20パック
162-0215	0.45μmニトロセルロース/フィルターペーパーサンドイッチ　7×8.5 cm、50パック
162-0234	0.45μmニトロセルロース/フィルターペーパーサンドイッチ　8.5×13.5 cm、20パック
162-0235	0.45μmニトロセルロース/フィルターペーパーサンドイッチ　8.5×13.5 cm、50パック
162-0238	イミュンブロット PVDF/フィルターペーパーサンドイッチ　8.5×13.5 cm、20パック
162-0239	イミュンブロット PVDF/フィルターペーパーサンドイッチ　8.5×13.5 cm、50パック
162-0236	シーケブロットPVDF/フィルターペーパーサンドイッチ　8.5×13.5 cm、20パック
162-0237	シーケブロットPVDF/フィルターペーパーサンドイッチ　8.5×13.5 cm、50パック
162-0115	0.45μmニトロセルロースメンブレン／ロール　30cm×3.5m　1ロール
162-0114	0.45μmニトロセルロースメンブレン／シート　15×9.2cm（10枚）
162-0145	0.45μmニトロセルロースメンブレン／シート　7×8.4cm（10枚）
162-0148	0.45μmニトロセルロースメンブレン／シート　11.5×16cm（10枚）
162-0112	0.2μmニトロセルロースメンブレン／ロール　30cm×3.5m　1ロール
162-0146	0.2μmニトロセルロースメンブレン／シート　7×8.4cm（10枚）
162-0147	0.2μmニトロセルロースメンブレン／シート　13.5×16.5cm（10枚）
162-0090	0.45μmサポート付ニトロセルロースメンブレン／シート　7×8.4cm（10枚）
162-0091	0.45μmサポート付ニトロセルロースメンブレン／シート　10×15cm（10枚）
162-0094	0.45μmサポート付ニトロセルロースメンブレン／ロール　30cm×3m　1ロール
162-0095	0.2μmサポート付ニトロセルロースメンブレン／シート　7×8.4cm（10枚）
162-0097	0.2μmサポート付ニトロセルロースメンブレン／ロール　30cm×3m　1ロール
162-0174	イミュン-ブロットPVDFメンブレン／シート　7×8.4cm（10枚）
162-0175	イミュン-ブロットPVDFメンブレン／シート　10×15cm（10枚）
162-0186	シーケ-ブロットPVDFメンブレン／シート　7×8.4cm（10枚）
162-0180	シーケ-ブロットPVDFメンブレン／シート　10×15cm（10枚）
162-0184	シーケ-ブロットPVDFメンブレン／ロール　26×330cm　1ロール

プレミックスバッファー

カタログ番号	製品名
161-0734	10×トリス/グリシン、1L
161-0771	10×トリス/グリシン、5Lキューブ
161-0774	20×SSC、1L
161-0775	20×SSC、5Lキューブ

Section 9　参考文献

1. Southern,E.M,J Mol.Biol.,98,503(1975).
2. Alwine,J.C.,Kemp,D.J.,Parker,B.A.,Reiser,J.,Renartj.,Stark,G.R.and Wahl,G.W.,Methods Enzymol.,68,220(1979).
3. Thomas,P.S.,Proc.Nat.Acad Sci.,77,5201(1980).
4. Seed,B.,Nuc.Acid Res.,10,1799(1982).
5. Renart.J.,Peiser,J.and Stark,G.R.,Proc.Nat.Acad.Sci.,76,3116(1979).
6. Bowen,P.,Steinberg,J.,Laemmli,U.K.and Weintraub,H.,Nuc.Acids Res.,8,1(1980).
7. Towbin, H., Staehelin, T.and gordon,j., Proc.Nat.Acad.Sci.,76,4350(1970).
8. Bittner, M., kupferer, P.and Morris, C.R., Anal. Biochem., 102, 459(1980).
9. Stellwag, E. J. and Dahlberg, A. E., Nuc. Acids Res., 8,299(1980).
10. Kutateladze,T.V.,Axelrod,B.D.,Gorbulev,V.G.,Belzhelarshaya,S.N.and Vartikyan,R.M.,Anal.Biochem.,100,129(1979).
11. Peudelhuber,T.L., Ball, D. J., Davis, A. H. and Garrard, W. J., Nuc. Acids Res., 10, 1311(1982).
12. Danner, D. B., Anal. Biochem., 125, 139(1982).
13. Bio-Rad Technical Bulletin 1110"Zeta-Probe Blotting Membranes" (1982).
14. Holland, L. J. and Wangh, L. H., Nuc Acids Res., 10, 3283(1983).
15. Syminton, J., Green, M. and Brackmann,k., Proc. Nat. Acad. Sci., 78, 177(1981).
16. Reiser,J.and Wardale,J.,Eur.J.Biochem.,114,569(1981).
17. Burnette, W. N., Anal. Biochem., 112, 195(1981).
18. Legocki, R. P. and Verma, D. P. S., Anal. Biochem., 111, 385(1981).
19. Lin, W. and Kasamatsu, H., Anal. Biochem,. 128, 302(1983).
20. Andeson, N. L., Nance, S. L., Pearson, T. W. and Anaderson, N.G., Electrophoresis, 3, 135(1982).
21. McLellan, T. and pamshaw, J. A. M., Biochem. Genetics. 19, 647(1981).
22. Gibson, W., Anal. Biochem., 118, 1(1981).
23. Hower, J. G. and Hershey, J. W. B., J. Biol. Chem., 2566, 12836(1981).
24. Erickson, P. G., Minier, L. N. and Lasher, P. S., J. Immun. Meth., 51, 241(1982).
25. Tsang, V. C. W., peralta, J. M. and Simons, A. R., Meth. Enzymol., 92, 377(1983).
26. Gershoni, J. M. and Palade, G. E., Anal. Biochem., 124, 396(1982).
27. Gershoni, J. M. and Palade, G. E., Anal. Biochem., 131, 1(1983).
28. Syminfton, J., "Two Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins: Methods and Applications." Celis, J. E. and Bravo, R., eds. Academic Press. N. Y., (1983).
29. Andrews, A. T., "Electrophoresis: Theory. Technipues. And biochemical and clinical application, "2 nd ed., Clarendon Press, Oxford.(1986).
30. Beisiegel, V., Electrophoresis, 7, 1(1986).
31. Bio-Rad Laboratories, unpublished.
32. Gershoni, J. M., in Advances in Electrophoresis. Vol. 1. Chrambach, A., Dunn, M. J. and Radola, B. J., eds., VCH, Weinheim, in press.
33. Gershoni, J. M., in methods of Biochemical Analysis. Vol. 33, Glick, D., ed., Wiley, New York, in press.
34. Bjerrum, O. J. and Schafer-Nielsen, C., Analytical Electrophoresis, M. J. Dunn, ed.(VCH, Weinheim), p. 315.
35. Dunn, S. D., Anal. Biochem., 157, 144(1986).
36. Zeta-Probe instruction Manual, Bio-Rad Laboratories. (1988)
37. Polvino, W. J., Saravis, C. E. and Cook. R. B., Electrophoresis, 4, 368(1983).
38. Bio-Rad Laboratories, Biotin-Blot Total Protein Stain Instruction Manual(1985).
39. Larochelle, W. J. and Froehner, S. C., J. Immunol. Meth., 92,65(1986).
40. Szewcyzyk, B. and kozloff, L. M., Anal. Biochem., 150, 403(1985).
41. Perides, G., Plagens, U. and Traub, P., Anal. Biochem., 152, 94(1986).

Section 10　保　証

バイオ・ラッドはCriterionトランスブロットセルについて購入後1年間の性能保証をいたしております。
保証期間内に生じた故障に対し、無償で修理・交換に応じます。
ただし、下記による故障についての保証はいたしかねます。

１．正規の使用によらない故障
２．バイオ・ラッドもしくはバイオ・ラッドが推奨する以外の試薬の使用、および改造による故障
３．事故および操作の誤りによる故障
４．天災による故障
５．バイオ・ラッド以外の付属品・交換部品の使用による故障
６．不適当な試薬、サンプルの使用による腐食・劣化

BIO-RAD 日本バイオ・ラッド　ラボラトリーズ株式会社

ライフサイエンス事業本部

本　　社	〒116-0014 東京都荒川区東日暮里5-7-18 コスモパークビル	☎(03)5811-6270 FAX.(03)5811-6272
神奈川営業所	〒222-0033 横浜市港北区新横浜2-7-3 フジビル	☎(045)476-0351 FAX.(045)476-0350
つくば営業所	〒305-0031 つくば市吾妻1-15-1 筑波司法会館	☎(029)852-0835 FAX.(029)852-0829
大阪営業所	〒532-0025 大阪市淀川区新北野1-14-11 第一生命ビル	☎(06)6308-6568 FAX.(06)6308-3064
名古屋営業所	〒465-0093 名古屋市名東区一社3-121-1 MIDORIビル	☎(052)702-2358 FAX.(052)702-2812
福岡営業所	〒812-0013 福岡市博多区博多駅東2-18-30 八重洲博多ビル	☎(092)475-4856 FAX.(092)475-4858
	※技術的お問い合わせは	☎(03)5811-6271 FAX.(03)5811-6272

M3128-0303

http://discover.bio-rad.co.jp